

# 재생의학 소재로서 폴리로텍세인을 이용한 유전자 전달

현 훈 · 유이 노부히코

## 1. 서론

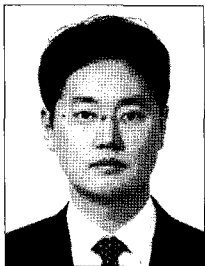
초분자 개념으로 설명되는 고분자 폴리머인 폴리로텍세인의 특징은 실에 구슬을 꿰듯이 선형고분자 사슬이 다수의 환형분자 내부를 통과하여 연동되어 있는 구조(mechanically interlocked structure)를 하고 있는 점이다. 그렇기 때문에 환형분자와 선형고분자 사슬 사이에 분자간력이 일어나지 않는 상태라고 가정하면 환형분자는 선형고분자 사슬을 따라 자유롭게 회전하거나 미끄러지는 운동이 가능하게 된다. 또한 그 선형고분자 사슬의 양쪽 말단 부분을 벌크한 캡핑분자로 막음으로써 환형분자가 빠져나가지 못하도록 갇힌 구조를 형성할 수 있다. 이렇듯 선형고분자와 환형분자가 만들어내는 특이한 구조를 가지고 있는 폴리머를 통틀어 폴리로텍세인이라 칭하고 있다. 좀 더 주목해야 할 점으로써 폴리로텍세인의 말단 부분의 캡핑분자를 제거하게 되면 갇혀있던 환형분자들이 선형고분자 사슬로부터 빠져나오게 되는데, 이러한 폴리로텍세인의 특성은 생체기능재료로서의 실재를 위해 매우 중요한 의미를 지니고 있다.

생체기능시스템에 대해 주시하고 있는 바와 같이 생체내의 정보전달기구 하나를 들여다보면 세포막 위에서의 리셉터 단백질의 유동화와 클러스터화, 세포막 내의 사이토시스 기능, 세포막 내 단백질의 인산화에 의한 재배열과 세포의 형태변화, 세포 내 소기관의 대사 및 물질 생산 등, 이처럼 고도의 계층적인 세포 내외의 구조가 분자간력의 교묘한 조절에 의해 임기응변적으로 기능발현을 담당하고 있다. 이렇듯 생체 자체가 정교하게 서로 비공유결합을 통해 활성화되는 구조로써 동적특성을 바탕으로 기능발현하는 점에서 착안하여, 폴리로텍세인의 동적특성이 생체기능을 이루어 낼 수 있는 중요한 재료로서의 가치가 기대되고 있다.

20세기 초반에 그 형성이 예측되었던 관통된 골격을 가지는 고분자 포접체로서의 슈도폴리로텍세인(양쪽 말단부분이 캡핑(bulky stopper)되어 있지 않은 상태로서 폴리로텍세인의 전단계 구조를 말함)은 그 형성구조가 1970년대에 처음으로 실험적으로 보고되었다.<sup>1</sup> 현재는 슈도폴리로텍세인의 양말단을 캡핑시킨 폴리로텍세인이 사이클로텍스트린이나 크라운에테르 등의 환형분자를 이용하여 다양한 방법으로 합성되고 있으며 다방면으로 그 기능설계가 연구되고 있다. 저자들은 사이클로텍스트린을 기본으로 하는 폴리로텍세인을 이용하여 생체재료로서의 응용을 연구 목표로 하고 있으며, 이러한 폴리로텍세인의 제조 방법은 1990년대에 보고된 Harada 그룹의 합성 방법을 기초로 하고 있다.<sup>2</sup> 본 특집에서는 폴리로텍세인의 동적특성을 이용한 생체기능재료로서의 응용 연구의 예를 소개하고자 한다.

## 2. 생체재료로서의 폴리로텍세인을 이용한 유전자 전달

고분자에 의한 궁극적인 생체기능의 하나로서 유전자(DNA) 전달체의 설계가 있다. 난치성 질병의 치료와 재생의학에의 응용을 목표로 유전자 요법이 매우 기대되고 있다. 그것을 실현하기 위해서는 유전자를 효과적으로 세포핵 내에 송달하는 것과 더불어 그것 자체에 독성이 없는 안전한 전달체의 설계가 불가결하다.<sup>3</sup> 레트로바이러스나 아데노바이러스를 사용하는 것으로 효율적인 유전자 전달이 기대될 수 있지만, 암세포로의 변이나 면역원성의 문제가 지적되고 있다. 인공적으로 합성한 비바이러스형 유전자 전달체는 상대적으로 안전하고 고효율적인 유전자 전달을 가능하게 하지만, 발현효율이나 독성의 측면에서는 불충분하다. 이를테면, 정맥투여된 후에 혈중안정성, 혈중으로부터 목



**현 훈**  
1999~ 2005 전북대학교 고분자나노공학과(학사)  
2005~ 2007 전북대학교 유기신물질공학과(석사)  
2008~ 현재 JAIST 재료과학과(박사과정)



**유이 노부히코**  
1981 일본상지대학교 고분자화학(학사)  
1983 일본상지대학교 고분자화학(석사)  
1985 일본상지대학교 고분자화학(박사)  
1992 동경여자의과대학 의용공학연구소  
1988 University of Twente (the Netherlands) 연구원  
1993~ 현재 JAIST 재료과학과 조교수, 교수

### Polyrotaxanes as a Gene Carrier

자이스트 재료과학과(Hoon Hyun and Nobuhiko Yui, School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, Nomi, Ishikawa 923-1292, Japan) e-mail: hhyun79@gmail.com

적세포로의 유입, 유입 후 엔도솜 내 효소분해에 의한 방출 방지(세포질 안으로의 유리), 세포질로부터 핵으로의 이행, 핵 내에서의 전사 등, 이처럼 많은 과정을 한번에 해결할 수 있는 전달체의 설계법이 여전히 요구되고 있다.

여러 예들 중 하나로, 비바이러스형 유전자 전달체로서 폴리에틸렌아민(PEI)과 같은 수용성의 양이온성 폴리머가 많이 연구되고 있다. 고분자량의 PEI는 DNA와의 폴리이온컴플렉스(polyplex) 형성이 용이하고 세포 내의 유입이나 핵 내로의 발현율도 높지만 강한 세포 독성이 문제이기 때문에 장래적으로 임상에 사용하기에는 실현가능성이 낮다. 한편, 저분자량의 PEI의 경우는 독성을 피하는 측면에서는 유리하지만 폴리플렉스의 안정성이나 세포핵 내로의 이행률이 낮기 때문에 이러한 문제로 역시 전달체로서의 실현가능성이 낮다. 최근에 세포질 내 또는 핵 내에 글루타치온(glutathione) 등의 환원효소가 고농도로 존재하고 있다는 점을 바탕으로 그러한 환원적인 조건하에 분해되는 다이설파이드(SS) 결합을 PEI 사슬에 도입하는 방법으로 독성을 피하고자 하는 실험이 시도되고 있으나,<sup>4</sup> SS결합이 제거된 후에도 PEI에 의한 과도한 안정성으로 인해 폴리플렉스의 붕괴가 일어나지 않는 점이 문제가 되고 있다.

Kataoka 그룹에서는 폴리아미노산과 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 이용하여 합성한 블록공중합체가 형성하는 고분자 마이셀에 의한 약물 전달 시스템의 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근에는 올리고에틸렌아민(OE)을 결사슬에 결합시킨 폴리아미노산 유도체 사슬과 PEG 사슬 사이에 SS결합을 도입시킨 블록공중합체와 DNA로부터 형성되는 고분자 마이셀에 의한 유전자 발현 활성이 신속하게 증강되는 점이 보고되고 있다.<sup>5</sup> 또한 에틸렌아민의 부분 구조인 1,2-diaminoethane 부위를 결사슬에 도입시킨 폴리아미노산 유도체와 PEG와의 블록공중합체를 설계하고 그 1,2-diaminoethane 부위를 pH 의존적 양성자화한 시스템을 기반으로 폴리플렉스를 형성시켜 DNA가 내포된 고분자 마이셀이 세포 내 엔도솜의 막을 불안정화시켜 효과적으로 세포질 유리를 야기시킴과 더불어, 높은 유전자 발현 활성과 독성을 피하는 연구 결과가 보고되고 있다.<sup>6</sup>

본 연구실에서는 Harashima, Maruyama 그룹들과 공동 연구로 하여 세포 내 분해성 폴리로텍세인을 전달체로 하는 유전자 전달 시스템의 유효성을 제안하고 연구해 오고 있다(그림 1). 다시 말하면, 세포 내 분해성 폴리로텍세인의 양말단에 캡핑된 벌크한 치환기가 세포질 내에서 떨어져 나가므로써 환형분자와 선형고분자 사슬로부터 형성되었던 초분자 구조가 해리되고, 결과적으로 DNA를 방출하게 되는 시스템이다. 세포 내 분해성 폴리로텍세인의 초분자 골격이 해리됨으로써 양이온성 폴리머인 폴리로텍세인이 저분자 양이온들로 변환되기 때

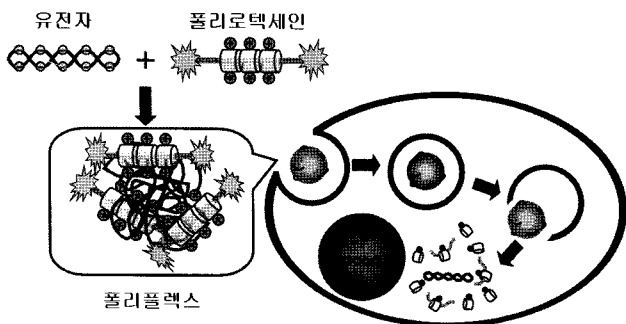


그림 1. 세포 내 분해성 폴리로텍세인에 의한 유전자 전달 모식도.

문에 DNA의 인산기와 폴리로텍세인의 아미노기 사이의 다가상호작용을 저하시켜 DNA를 방출함과 더불어, 양이온성기가 고밀도로 존재하는 것이 원인이 되는 세포 독성도 피할 수 있는 장점들이 기대된다. 안정한 폴리플렉스 형성은 세포 내로 유입 시에는 유리하지만, 세포 내에서의 DNA 방출에는 불리하다. 이러한 점에서 폴리로텍세인을 합성할 때 선형고분자 사슬의 양말단 부위에 세포 내에서 분해되는 관능기를 도입한다면 그 분해가 일어남과 동시에 초분자 골격의 해리에 의해 DNA 방출과 함께 세포 독성의 문제를 모두 해결할 수 있을 것으로 예상되었다.

이에 본 연구실에서는 양말단 부위에 SS결합을 가지는 PEG와  $\alpha$ -사이클로덱스트린( $\alpha$ -CD)으로부터 만들어지는 세포 내 분해성 폴리로텍세인을 합성하고  $\alpha$ -CD의 수산기에 3차 아미노기(dimethyl-aminoethyl)를 도입하였다.<sup>7</sup> 이러한 세포 내 분해성 폴리로텍세인은 실험 결과 적은 양의 양이온으로도 DNA와 안정한 폴리플렉스를 형성하는 특징이 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 앞서 언급한 환원적인 조건을 이용하여 SS결합의 분해, 분리에 의한 초분자 구조의 해리, 이로 인해 일어나는 DNA의 방출을 확인하였다.

그에 따른 결과로서 세포 내 분해성 폴리로텍세인에 의한 유전자 발현은 낮은 N/P 비율에 의거하여 PEI의 10배 이상의 수치를 보였으며, N/P비율을 증대시켜도 세포 독성이 거의 보이지 않았다. SS결합을 도입하지 않은 폴리로텍세인의 유전자 발현은 500분의 1 이하로 나타났으며, 세포 독성 또한 PEI와 비슷한 양상의 N/P 비율로 증대되어 있었다. 이에 SS결합의 세포 내 분해로 인한 초분자 구조의 해리가 유전자 발현과 세포 독성 측면에 있어 중요한 역할을 하고 있음이 확인되었다.

세포 내 분해성 폴리로텍세인이 우수한 유전자 전달 특성을 발휘한다는 사실은 폴리로텍세인에 의한 효과적 폴리플렉스의 형성과, SS결합의 세포 내 분해와 함께 일어나는 초분자 구조의 해리에 의한 DNA의 방출이 처음에 설계한 대로 세포 내에서 실현할 수 있음을 보여주고 있다. 이는 폴리로텍세인이 가지는 동적인 특징과 비공유결합에 의한 결합체인 것을 적절하게 이용하는 것으로써 종래의 양이온성 폴리머에 의거한 여러 문제점을 해결할 수 있는 생체재료로서의 가치가 기대된다.<sup>8</sup>

현재는 세포 내 분해성 폴리로텍세인의 구조 파라미터에 착안하여 상세한 분석을 진행하고 있으며 그것을 기초로 하여 유전자 전달체로서의 기능 향상을 목표로 하고 있다.<sup>9</sup> 그에 따른 하나의 연구로서 Harashima 그룹이 개발한 multifunctional envelope-type nano device (MEND)와의 융합화에 의한 유전자 전달 시스템을 추진하고 있다. 이미 Harashima 그룹은 바이러스와 비바이러스형 유전자 전달체가 유전자 발현에 있어서 큰 차이점이 핵 이행 후의 과정에 있다는 것을 명확하게 밝혀냈다.<sup>10</sup>

이러한 점을 바탕으로 핵 내에서의 DNA 방출과정을 개선하는 것이 유효한 해결수단의 하나임을 가설로 세우고, 전달체의 외부 껍질로서 MEND를 이용하여 세포 내 분해성 폴리로텍세인과 DNA와의 폴리플렉스를 봉입한 융합형 전달 시스템을 제안하였다. MEND는 세포 내로의 유입, 엔도솜의 방출, 핵막 투과에 유효한 점들이 이미 확인되었기 때문에, 그것을 전제로 하여 세포 내 분해성 폴리로텍세인에 의한 핵 내에서의 DNA 방출을 기대하는 시스템이다(그림 2).

내핵에 이용된 폴리플렉스의 환원적 환경하에서의 DNA 방출능을 전기영동법에 의해 평가한 결과, 세포 내 분해성 폴리로텍세인은 중

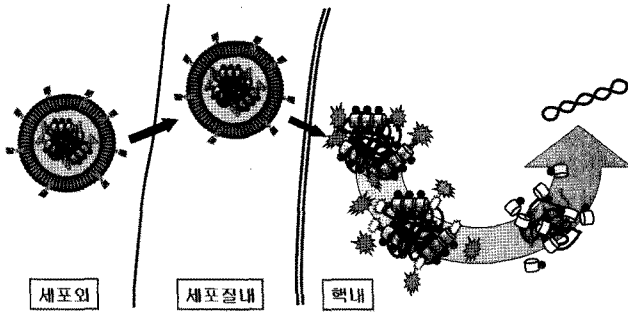


그림 2. 세포 내 분해성 폴리로택세인과 MEND와의 융합형 전달체 시스템.

래부터 높은 유전자 방출능이 보고된 protamine보다도 높은 수치를 보였다. 또한 융합형 전달체 시스템은 protamine 등 종래의 유전자 전달체와 비교하여 상당히 높은 유전자 발현 활성을 보였다. 이들 결과로부터 유전자 방출능의 개선이 비바이러스형 전달체의 유전자 발현 향상에 있어 중요한 파라미터의 하나임을 시사하고 있다.<sup>11</sup> 이러한 융합형 전달체 시스템에 대해서는 Harashima 그룹이 중심이 되어 상세한 세포 내 동태를 분석하고 그에 대한 실현성을 검증하고 있는 단계이다.

### 3. 맺음말

본 특집은 폴리로택세인을 기초로 한 새로운 생체재료의 설계를 중심으로 설명하고 있다. 연구가 아직 진행 중에 있으며 초분자 특유의 분자 운동성과 생체기능 발현 등에 대해서도 학문적인 구축과 성장을 위해 좀더 다양하고 많은 연구 결과가 요구되고 있다. 옛말에 학문을 위해 시험이 있고 시험이 있으면 그 학문이 성립된다는 말이 있는데,

지금이야말로 연구에 있어서 응용을 위해서는 기반이 되는 분자설계가 불가결하고 그 기반이 구축되면 장기간의 응용이 가능하게 된다.

### 참고문헌

1. H. W. Gibson and H. Marand, *Adv. Mater.*, **5**, 11 (1993).
2. A. Harada and M. Kamachi, *Macromolecules*, **23**, 2821 (1990).
3. J. A. Wolff, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 768 (2002).
4. M. Neu, O. Germershaus, S. Mao, K. H. Voigt, M. Behe, and T. Kissel, *J. Control. Release*, **118**, 370 (2007).
5. S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, and K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 6001 (2008).
6. K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, and K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 16287 (2008).
7. T. Ooya, H. S. Choi, A. Yamashita, N. Yui, Y. Sugaya, A. Kano, A. Maruyama, H. Akita, R. Ito, K. Kogure, and H. Harashima, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3852 (2006).
8. A. Yamashita, N. Yui, T. Ooya, A. Kano, A. Maruyama, H. Akita, K. Kogure, and H. Harashima, *Nat. Protoc.*, **1**, 2861 (2006).
9. A. Yamashita, R. Katoono, N. Yui, T. Ooya, A. Maruyama, H. Akita, K. Kogure, and H. Harashima, *J. Control. Release*, **131**, 137 (2008).
10. S. Hama, H. Akita, R. Ito, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, and H. Harashima, *Mol. Ther.*, **13**, 786 (2004).
11. Y. Yamada, T. Nomura, H. Harashima, A. Yamashita, R. Katoono, and N. Yui, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1218 (2010).